云 南 植 物 研 究 1990; 12(3): 317—322
Acta Botanica Yunnanica

籼稻幼穗细胞悬浮培养物的胚胎发生和植株再生

李耿光 张兰英 陈如珠 李开莲

(中国科学院华南植物研究所，广州510650)

摘要 籼稻幼穗诱导的愈伤组织，培养在MS基本成分并附加1—7 mg/l 2,4-D和5%椰子汁的液体培养基中，得到胚性小细胞团。这些细胞的特征是：形状小而圆，细胞壁薄，细胞内为稠密的胞质所充满，没有或具小的液泡，具淀粉粒。把它们转移到含1 mg/l BA的琼脂培养基中，在扫描电镜下观察到球形、心形、梨形和成熟胚，两周后萌发成具根、芽的完整植株。10—14天龄的悬浮培养物具有较高的再生植株能力。

关键词 悬浮培养；胚胎发生；幼穗；籼稻

SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION FROM SUSPENSION CULTURES OF YOUNG INFLORESCENCES OF INDICA RICE

Li Gengguang, Zhang Lanying, Chen Ruzhu, Li Kailian

(*South China Institute of Botany, Academia Sinica*, Guangzhou 510650)

Abstract Calli derived from young inflorescences of indica rice were placed in MS liquid medium supplemented with 1—7 mg/l 2,4-D and 5% coconut milk and developed into small embryogenic clusters which were consisted of small, round and thin-walled cells with dense cytoplasm containing starch granules, but small or no vacuoles. when the clusters were transferred to MS agar medium supplemented with 1 mg/l BA, some were found at globular-, heart-, pear-shaped and mature embyo stages by scanning electromicroscope, and the embryoids germinated into intact plantlets after two weeks. 10—to 14—day old suspension cultures had higher capacity to regenerate plantlets.

Key words Suspension culture; Embryogenesis; Young inflorescences; Indica rice

水稻是世界上重要的粮食作物，应用离体培养技术对它的研究非常广泛，近几年来证实了水稻组织培养的体细胞胚胎发生[1—7]，细胞悬浮培养植株再生[8—11]，和悬浮

1989-06-09收稿

培养胚性细胞的原生质体再生植株[12—16]。本文首次报道籼稻幼穗细胞悬浮培养物，通过体细胞胚胎发生途径再生完整植株，为籼稻细胞悬浮培养体细胞胚胎发生提供证据，为进一步的籼稻原生质体培养与遗传操作提供试验材料。

材料与方法

以籼稻包源A×两小矮（Indica rice oryza sativa L. subspecies Bao Yuan A x Liang Xiao ai）材料，供试外植体为幼穗。从田间取回合适的植株，剥除外叶片和叶鞘直至剩下2—3层叶鞘包裹着的幼穗及其着生的节。经常规消毒处理后，取出幼穗（以0.8—1.2 cm长的为宜），切成约2 mm长的切段，接种于MS附加各种激素的固体培养基中，以诱导愈伤组织。培养于26±2°C，黑暗条件下。

从幼穗切段诱导来的表面平滑致密，黄白色；或呈颗粒状，质地密实，浅黄色的愈伤组织，用镊子捏碎或切成小薄片转移至装有30 ml液体培养基的三角瓶中。于26±2°C，散射光条件下，水平旋转摇床振荡培养，速度为120 rpm。在开始的半月内每隔4—5天换新鲜培养液一次，以后每隔7—10天继代一次，3个月后得到胚性细胞悬浮培养物。

将悬浮培养中得到的由小而圆的单细胞及4—30个细胞组成的细胞团所组成的胚性细胞悬浮培养物，移植至含各种激素配比的MS固体分化培养基上，置于光强度2000 lx，每天光照12—14小时下作植株再生试验。

扫描电镜观察用培养的新鲜材料，干冰冷冻后进行。根尖染色体计数，用无水乙醇-冰醋酸（3∶1）固定后，60°C下酸解2—4分钟，改良品红染色压片观察。

结　　果

1.幼穗愈伤组织的诱导

幼穗切段接种在MS固体基本培养基上，10天后开始从穗粒出现愈伤组织。诱导愈伤组织的激素组合有：2,4-D（1 mg/l）；2,4-D（1 mg/l）+KT 2 mg/l）；2,4-D（1 mg/l）+KT（0.3 mg/l）+NAA（1 mg/l）。结果得出：2,4-D单独使用诱导籼穗产生的愈伤组织增殖较慢；多数为黄白色緻密颗粒堆积，少量白色松软，部分根分化；加有KT的愈伤组织增殖较快，质地与单独2,4-D的类似，除部分根分化外还有个别芽；再加上NAA组合的愈伤组织增殖最快，多为白色松软颗粒堆积，具粘液个别分化根。胚性细胞悬浮培养物的获得来自于只加2,4-D或再加KT中诱导的愈伤组织。

2.胚性细胞悬浮培养物的建立

从幼穗诱导的黄白色，緻密颗粒状堆积的愈伤组织，转入含不同浓度2,4-D（1，2.5，5.0，7.5 mg/l）和5%CM的液体培养基中作悬浮培养，两周后检查游离细胞主要有两类：大多数是长形、壁厚、胞质稀疏，少淀粉粒，具大液泡的细胞；少数是小而圆的细胞(图1)。随着继代次数增加，圆形细胞及细胞团增多至占比例一半，由于它们增殖快，再经过2—3次继代，培养物中几乎全是这类细胞及细胞团，其特点是：细

胞小，呈圆形，细胞壁薄，胞内充满稠密的胞质，具淀粉粒，核较大，多数为4—20个细胞组成的小团，细胞之间重叠紧密，看不到细胞间隙(图2)；在所用2,4-D浓度范围内细胞系都生长良好，但高浓度中的细胞团比低浓度中的略小；在培养过程的前期，还观察到介乎于上述两类之间的细胞，形状如短棒；有时还观察到少量似球形胚结构团块，在悬浮培养中没有发现它们进一步发育和出现器官分化。

3.体细胞胚胎的发育和萌发

将胚性细胞悬浮培养物移植到促使器官分化的MS固体培养基中（如表1），10天后有些愈伤组织块的局部变成白色稠密，并有瘤状突起，扫描电子显微镜观察，可看到类似合子胚各发育阶段的胚状体：球形、心形、眉形和成熟胚(图3、4)，图中看到成熟胚可分两端，具毛状物的一端是胚根，另一端是胚芽。随后愈伤组织块表面陆续出现绿点，在扫描电镜下观察到芽及盾片结构(图5、6)，胚状体萌发。大多数绿点很快伸长，叶片展开，与此同时长出根系成为完整植株。有部分绿点不能伸长，一直保持肉眼可见的绿点状态。我们观察到在含ZT的分化培养基中有较多的绿点不能长成苗。

已建立的悬浮胚性细胞系，经过7个月的继代培养，仍具有分化正常绿苗的能力，但成苗率明显降低，且白化苗数量明显增加。

4.影响体细胞胚胎发育成苗的因素

分化培养基中的激素　所用激素种类及浓度列于表1，它们在试验浓度范围内（0.1、0.25、0.5、1.0 mg/l），对体细胞胚胎发育成苗的效果随浓度的提高成苗数有所增加；1 mg/l BA的效果较佳，分化出51株苗；ZT和KT的效果次之，Zip的作用较差。另外还用IAA（0.1或0.2 mg/l）与KT（2 mg/l），BA（1 mg/l）或ZT(0.5mg/l)分别搭配使用，结果还是BA+IAA的组合分化苗数为多，但比BA单独使用时少。

表1　细胞分裂素对籼稻体细胞胚胎发育成苗的作用

Table 1　Effect of cytokinin on the number of plantlets from the somatic embryoids of Indica rice

种类 Kinds	浓度 (concentrations) (mg/l) 0.1	0.25	0.5	1.0
	分化苗数 (Number of differentiated plantlets)			
KT	2	3	10	13
BA	6	13	13	51
2iP	1	3	5	8
ZT	5	5	8	14

1.每组供试细胞培养物团块84(No 84 of cultures from cell suspension)

2.悬浮培养11—13天(11—13 days of suspension culture)

悬浮培养基中2,4-D浓度　将同一天龄不同2,4-D浓度(1、2.5、7.5 mg/l)中生长的细胞悬浮培养物，转接于含不同浓度的BA培养基中所分化的苗数看，2,4-D浓度为1—7.5 mg/l中生长的培养物，都有完整植株分化，其中以1 mg/l浓度的成苗数多，共接160个细胞团块，分化出苗43株。

表 2 悬浮培养时间对分化苗数影响

Table 2 Effect of time of suspension culture on the differentiated plantlets

悬浮培养天数 Days of suspension culture	接种培养物块数 No. of plated cultures	分化苗数 No. of differentiated buds
7—9	204	20
10—14	416	84
15—19	356	18

悬浮培养时间　悬浮培养物中所包含的胚性细胞与细胞团的生长情况与发育程度直接影响到它们转接于分化培养基后的胚状体形成数量及发育状况，从而影响分化成苗的数量。表 2 是不同培养天数的分化试验结果，从中看出，液体悬浮培养10—14天的培养物，具有较高的分化成苗力。

5.试管苗移栽

在本实验条件下，从胚性细胞团产生的胚状体再萌发的小植株都是完整的，它们都具有旺盛的绿叶和发达的根系（图 7），将植株从培养瓶中取出，洗掉附在根上的琼脂，并在自来水中浸泡 4 — 5 小时后，移栽于土壤盆中，前10天置于散射光下，后移置于露天生长（图 8），能开花结实。对植株根尖染色体检查结果，经体细胞胚胎再生的植株染色体数正常，为2n＝24。

讨　论

近几年来，尽管从水稻的器官、组织、细胞培养均有再生植株成功的报道，然而细胞悬浮培养的研究还属有限的范围。原生质体培养再生植株的例子主要是利用悬浮培养物作为分离原生质体材料，但培养成功可能性还受基因型限制，试验本身还缺乏应有的重演性。水稻单细胞再生植株成功的还极少，而这正是在细胞和分子水平上改良水稻品种最困难、最关键的一步，因此广泛深入研究悬浮培养中细胞的生长，分裂和分化，胚性细胞和愈伤组织的形成及植株再生的条件，规律性，建立胚性细胞悬浮培养物的实验系统是很有必要的。

致谢　试验材料由本所梁敬焜同志提供

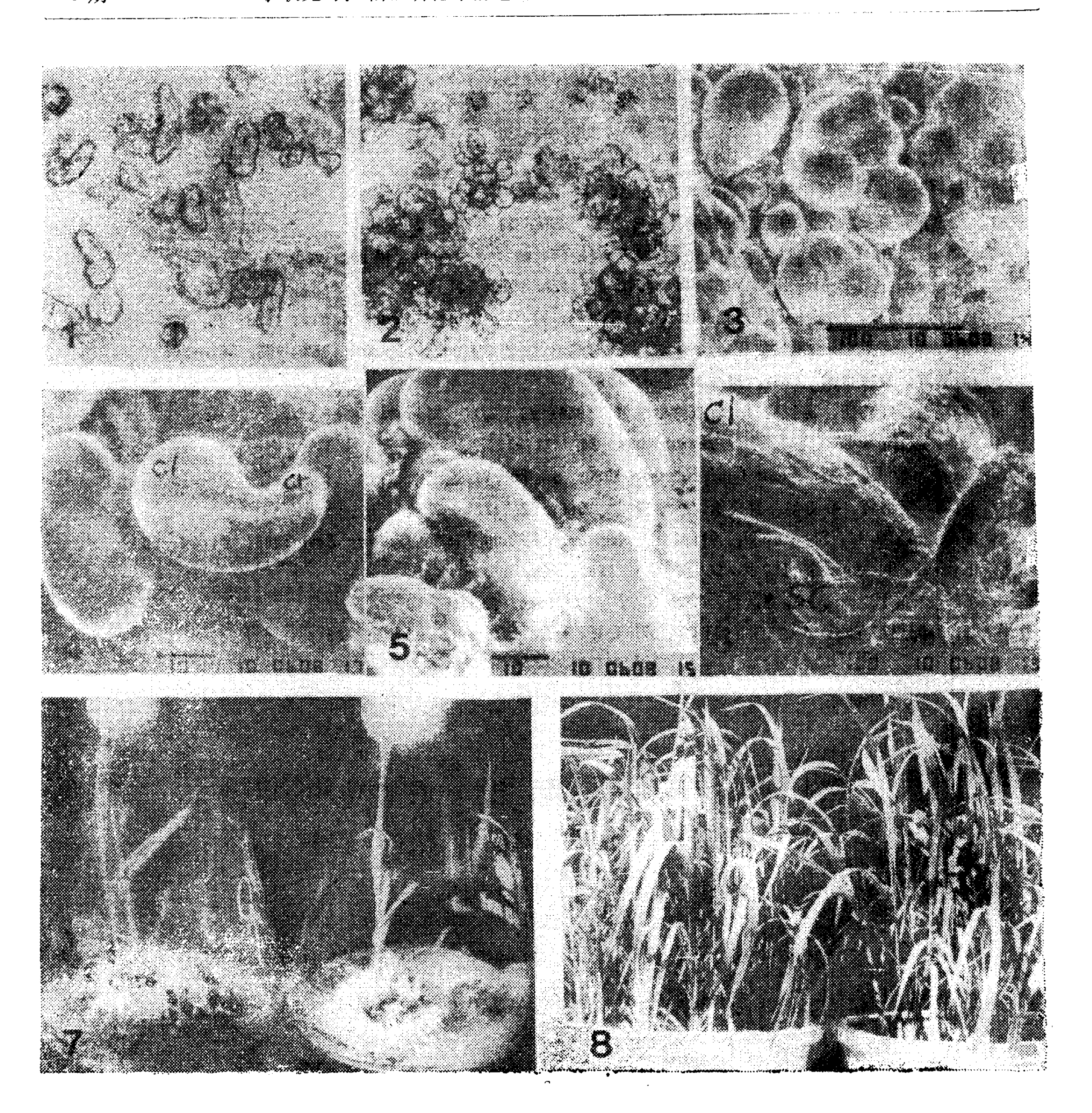


图 1　1.悬浮培养初期的非胚性长形细胞及圆形细胞.×512　　2.胚性细胞悬浮培养物，包括单细胞及结构紧密的细胞丛.×512　　3、4，球形、心形，鱼雷及成熟胚×400，×1600。　　5、6，具胚芽鞘及盾片结构的成熟胚×1600、×240　　7.芽长根成完整植株。　　8.盆栽苗。

Fig. 1　1. showing compact, small, globular embryogenic cells and elongated non-embryogenic cells in early suspension culture×512　　2. embryogenic suspension cultures, including single cells and compact cell clusters×512　　3.4, showing globular, heart, topedo-shaped and mature embryoids×400, ×1600　　5.6, mature embryo with coleoptile and scutellum　　7. plantlets　　8. plants grown in pot.

参 考 文 献

1 王大元. 细胞生物学杂志 1984; 6 (1): 16—20

2 张树录. 植物生理学通讯 1985 (6): 15—20

3 凌定厚, 陈婉英, 陈梅芳, 马镇荣. 遗传学报 1984; 11 (1): 26—32

4 Chen T H, Ling L, Chen S C. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1985; 4: 51—54

5 Genovesi A D, Magill C W. *Plant Cell Reports* 1982; 1: 257—260

6 Heyser J W, Dykes T A Demott, K J, Nabors. M W. *Plant Science Letters* 1983; 29: 175—187

7 Wernicke W, Brettal R, Wakizuka T, Potrykus I. Z *Pflanzenphysiol* 1982; 103: 361—365

8 叶和春. 植物学报 1984; 26 (1): 52—59

9 邹高治, 叶鸣明, 葛扣麟等. 复旦大学学报 1986; 25 (3): 335—340

10 Abe T, Futsuhara Y. *Jap J Breed* 1984; 34: 147—155

11 Zimny J, Lorz H. *Plant Cell Reports* 1986; 5: 89—92

12 雷鸣, 李向辉, 孙勇如, 黄美娟. 科学通报 1986; 22: 1729—1731

13 Fujimura T M, Sakurai H, Akagi T, Nagishi A. *Plant Tissue Culture Lett* 1985; 2: 74—75

14 Kyozuka J, Yusuyki H, Ko S, *M G G* 1987; 206: 408—413

15 Toriyama K, Kokochi H, Takehiko S. *T A G* 1986; 73: 16—19

16 Yamada Y, Yang Z Q, Tang D T. *Plant Cell Reports* 1986; 5: 85—88